

모기유충에 살충력이 있는 *Bacillus thuringiensis* subsp. *darmstadiensis* 73E10-2의 내독소의 용혈성 인자의 정제

김광현^{1*} · 이기희¹ · 홍용기²

¹동의대학교 자연대학 미생물학과, ²부산수산대학교 자연대학 생물공학과

Purification of hemolysin in mosquitocidal delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *darmstadiensis* 73E10-2

Kim, Kwang-Hyeon^{1*}, Gee-Hee Lee¹ and Yong-Gi Hong²

¹Department of Microbiology, College of Natural Science, Donggeui University, Pusan 614-714, Korea

²Department of Biotechnology, College of Natural Science, National Fisheries University of Pusan,
Pusan 608-020, Korea

Abstract — The hemolytic polypeptide in delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *darmstadiensis* 73E10-2 was purified by Sephadex G-100 gel filtration and DEAE-cellulose ion exchange column chromatography. The purity of hemolysin was confirmed by ouchterlony test and SDS-PAGE. The molecular weight of the purified hemolysin was approximately 64 KDa by SDS-PAGE. The purified hemolysin has not mosquitocidal activity against larvae of *Aedes aegypti*, but hemolytic activity on red blood cells of rat. There is no serological relationship between delta-endotoxin from *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* and the purified hemolysin from the strain 73E10-2.

모기에만 특이적인 독성을 나타내는 균주 중에 *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*와 *B. thuringiensis* subsp. *darmstadiensis* 73E10-2의 내독소에 대한 연구에서 *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* 균주의 내독소 유전자와 *B. thuringiensis* subsp. *darmstadiensis* 73E10-2 균주의 plasmid를 hybridization시킨 결과 서로 상이하였으나 두 균주의 내독소의 항원-항체 사이의 이중면역 확산반응에서 부분적인 침강선이 인정되었다는 Bourgouin 등의 보고(1)에 따라 본인 등은 전보(2)에서 기술한 바와 같이 양균주의 내독소는 서로 상이하였으나, 동일한 기원의 단백질 하나가 양균주의 내독소에 혼존하고 있음을 알았으며, 또한 *B. thuringiensis* subsp. *darmstadiensis* 73E10-2 균주와 *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* 균주의

모기유충에 대한 주 독소단백질을 각각의 내독소로부터 분리정제하여 면역학적인 실험을 행해 본 결과 두 균주의 내독소에 존재하는 모기유충에 대한 주 독소단백질이 전혀 서로 상이하였다(3)는 결론에 도달하여 우선 *B. thuringiensis* subsp. *darmstadiensis* 73E10-2 균주의 내독소로부터 용혈성 인자를 분리정제하여 *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*의 내독소와 면역학적으로 동일한 기원으로부터 유래되었는지의 유무를 조사코자 한다.

재료 및 방법

균의 배양 및 내독소 분리

Bacillus thuringiensis subsp. *darmstadiensis* 73E10-2(Btd)와 *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*(Bti)가 본 실험에 사용되었으며, 이들 균주는 일본 Kyushu대학 Aizawa 교수로부터 분양받았다. 또한, 이들 균주는 TYG 배지(tryptone 0.5%, yeast extract 0.5%,

Key words: *Bacillus thuringiensis* subsp. *darmstadiensis* 73E10-2, mosquitocidal delta-endotoxin, purification of hemolysin

*Corresponding author

glucose 1.0%, K_2HPO_4 0.5%, pH 7.2)에서 완전히 포자가 형성될 때까지 28°C에서 배양시켰다. 내독소 분리는 Cheung과 Hammock의 방법(4)에 따라 설탕 밀도균배법으로 8500×g에서 30분간 원심분리하여 모으고 -20°C에 보존하면서 사용하였다.

Sephadex G-100 gel filtration

분리된 Btd의 내독소는 0.1 N NaOH 용액으로 37°C에서 2시간 용해시킨 후 미리 20 mM Tris-HCl buffer(pH 8.5)로 평형시킨 Sephadex G-100 gel을 충전한 column($\phi 2.0 \times 40$ cm)에 주입하여 filtration시켰다. 이 때 column으로부터 용출량은 3 ml/tube이었으며, 용출속도는 10 ml/hr이었다.

DEAE-Cellulose ion exchange column chromatography

Sephadex G-100 gel filtration으로부터 모은 hemolysin은 DEAE-cellulose ion exchange column chromatography를 행하였다. 즉, 20 mM Tris-HCl buffer로 평형시킨 DEAE-cellulose column($\phi 2.0 \times 5$ cm)에 hemolysin을 흡착시키고 0.4 M KCl이 함유된 동일한 완충액으로 linear gradient를 행하여 hemolysin을 정제하였다. 이 때 용출량은 5 ml/tube, 용출속도는 15 ml/hr이었다.

SDS-PAGE 및 hemolysin의 분자량 측정

정제된 hemolysin은 Laemmli 방법(5)에 따라 15% SDS-polyacrylamide gel로 전기영동(25 mA, 5시간)하여 순도검정과 분자량을 측정하였다. 이 때 gel 염색은 coomassie blue로 행하였으며, 또한 분자량 측정용 Marker는 Sigma사의 trypsinogen(24 KDa), egg albumin(45 KDa) 및 bovine serum albumin(66 KDa)이 사용되었다.

단백질정량 및 hemolysin의 활성측정

단백질정량은 Lowery의 방법(6)에 따라 행하였으며, hemolysin의 활성측정은 Yu의 방법(7)에 따라 rat의 적혈구를 사용하였다.

모기유충에 대한 독성시험

내독소 및 그 용해단백질의 모기유충에 대한 LC_{50} 측정은 Reed와 Muench의 방법(8)에 따라 산출하였

다. 모기유충은 본 실험실에서 사육된 *Aedes aegypti*의 알을 25°C에서 부화시키고 4일간 사육하여 사용하였다. 용액상태의 내독소 단백질은 진한 초산으로 pH 4.5가 될 때까지 첨가하여 침전시키고, 형성된 침전물에 증류수를 첨가하여 원심분리(13,000×g, 30 min, 4°C)시켜서 남아있는 초산을 제거시킨 후 모기유충에 대한 독성시험을 행하였다.

Hemolysin의 항체조제 및 정제

정제된 hemolysin 용액(단백질농도; 1.0 mg/ml) 1.0 ml와 complete freund adjuvant(Sigma Co.) 1.0 ml를 잘 섞어서 토끼에 피하주사하였다. 일주일 후 다시 동일량의 항원과 complete freund adjuvant 잘 섞고 토끼에 피하주사하였다. 2차 주사하고 난 일주일 후에는 동일량의 항원만 1.0 ml를 일주일 간격으로 2회 토끼에 피하주사하였다. 최종 항원주사 후 일주일 이 지나서 토끼로부터 혈액을 채취하고, 원심분리(1,000×g, 30분간)하여 항혈청을 분리시킨 후 56°C에서 30분간 비동화시켰다. 비동화시킨 항혈청은 $Na_2SO_4 \cdot 10H_2O$ 로 염색시켰다. 그 후 생성된 침전단백질을 70 mM PBS(phosphate buffer saline, pH 7.5)로 투석시켜서 Johnstone과 Thorpe 등의 방법(9)에 따라 70 mM PBS buffer(pH 6.3)로 충전시킨 DEAE-cellulose ion exchange column chromatography($\phi 1.0 \times 7.0$ cm)를 행하여 비흡착부분을 정제된 항체로 사용하였다.

이중면역 확산법

Smith와 Ulrich가 기술한 방법(10)에 따라 0.01% NaN_3 가 함유된 0.2 M PBS buffer(pH 7.2)에 용해한 0.9% agarose(Sigma Co.) gel상에서 행하였으며, 형성된 침강선은 4°C에서 4일간 관찰하였다.

효소항체법

항원(정제된 hemolysin이나 용해된 내독소단백질)이 Voller 등의 방법(11)으로 microplate의 well에 흡착시켰다(4°C, 하룻밤). 그 후 well은 washing buffer(pH 7.2)로 3회 씻은 후 항체(1:2,000 희석액)를 가하여 25°C에서 3시간 동안 항원과 결합시켰다. 다시 well을 3회 씻은 후 goatantirabbit immunoglobulin alkaline phosphatase conjugate(Sigma Co.)가 1:2,000으로 희석하여 항체에 흡착(25°C, 3시간)시켰다.

그 후 10% diethanolamine buffer(pH 9.8)에 용해된 기질 p-nitrophenyl phosphate는 conjugate에 첨가되어 반응시키고 ELISA(enzyme linked immuno assay) Reader로 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

결과 및 고찰

Sephadex G-100 gel filtration

Btd균주의 내독소는 0.1 N NaOH로 용해(37°C, 2 시간)하여 미리 20 mM Tris-HCl(pH 8.5)로 충전된 Sephadex G-100 gel filtration시켰으며, 그 결과 Fig. 1에서와 같이 2개의 peak가 얻어졌으며, 또한 이들 각각의 peak로부터 hemolytic activity와 mosquitocidal activity를 조사해본 결과 peak 1에서는 mosquitocidal activity가 peak 2에서는 hemolytic activity가 나타났다(Table 1).

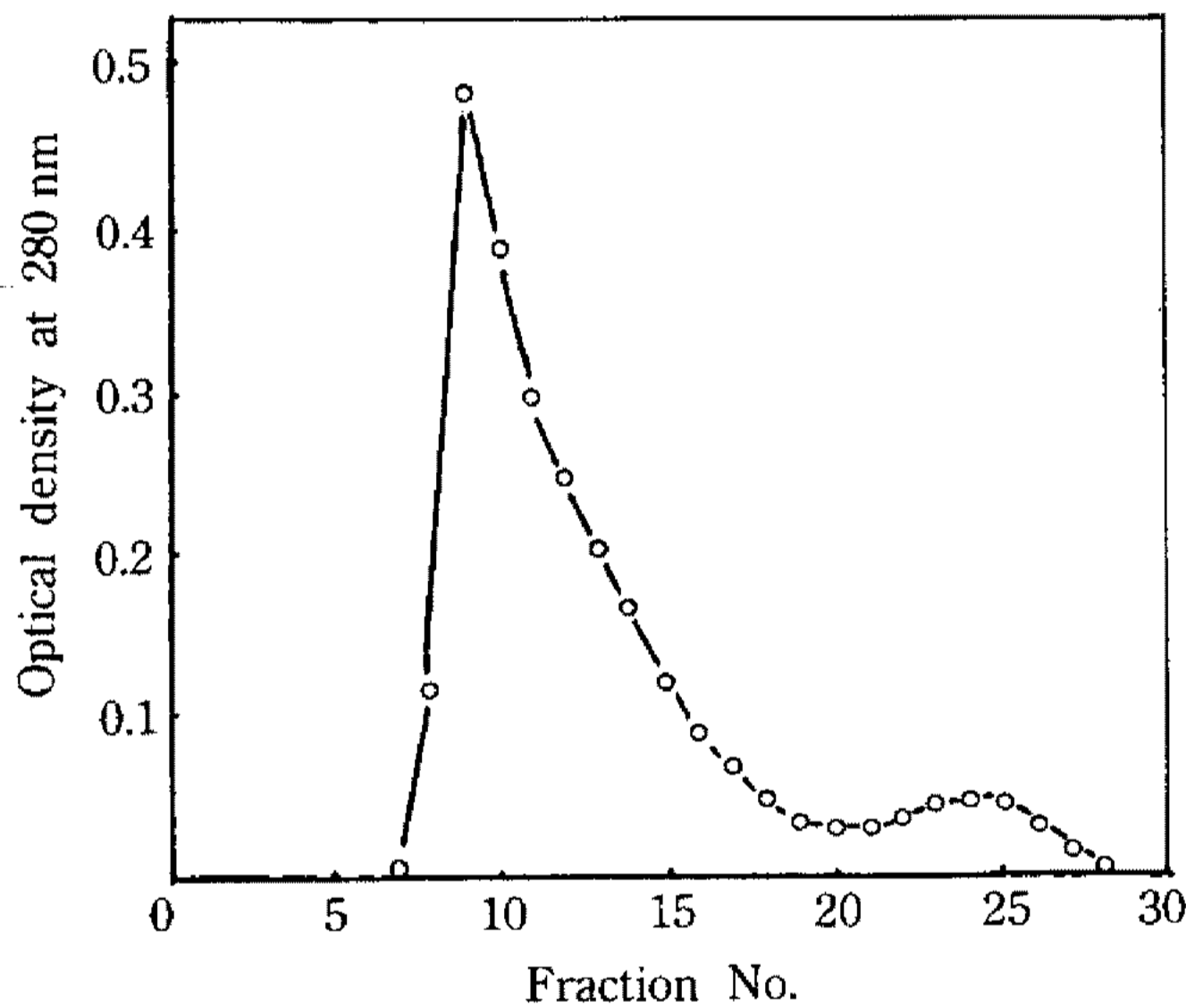


Fig. 1. Sephadex G-100 gel filtration.
The solubilized toxin with 0.1 N NaOH was charged into the column which was swollen with 20 mM Tris-HCl buffer (pH 8.5). The same buffer was eluted at speed of 10 ml/hr into the column.

Table 1. Hemolytic activity of protein fraction in delta-endotoxin

Protein fraction	LC ₅₀ (µg/ml)	Hemolytic activity (µg/ml)
Delta-endotoxin of Btd	0.092	above 345
Sephadex G-100 peak 1	6.4	above 2050
peak 2	none	222.5
DEAE-cellulose peak 1	none	135
peak 2	none	none

The titer for hemolytic activity was expressed at the lowest protein concentration showing 100% lysis of red blood cells of rat.

DEAE-cellulose ion exchange column chromatography

Sephadex G-100 gel filtration된 peak 2(hemolysin)는 모아서 다시 DEAE-cellulose ion exchange column chromatography를 행하였다. 그 결과 2개의 peak가 나타났으며 이들 각각의 peak로부터 hemolysin 활성을 조사해 본 결과 peak 1에서만 135 µg/ml로 나타났다(Fig. 2).

SDS-polyacrylamide gel 전기영동

Btd균주의 정제된 hemolysin(DEAE-cellulose ion exchange column chromatography의 peak 1 fraction)을 Laemmli의 방법(5)에 따라 SDS-polyacrylamide gel 전기영동함으로써 hemolysin의 순도를 검정하였다. 그 결과 Fig. 3에서와 같이 단일한 band (MW 64 KDa)를 확인할 수 있었다. 이는 *in vivo* 상태에서 모기유충에는 전혀 독성을 나타내지 않고 hemolysin 활성만을 가지고 있어 Drobniowski 등 (12)이 정제한 *in vitro*상에서 제 2의 mosquitocidal factor인 hemolysin(28 KDa)과는 차이가 있다.

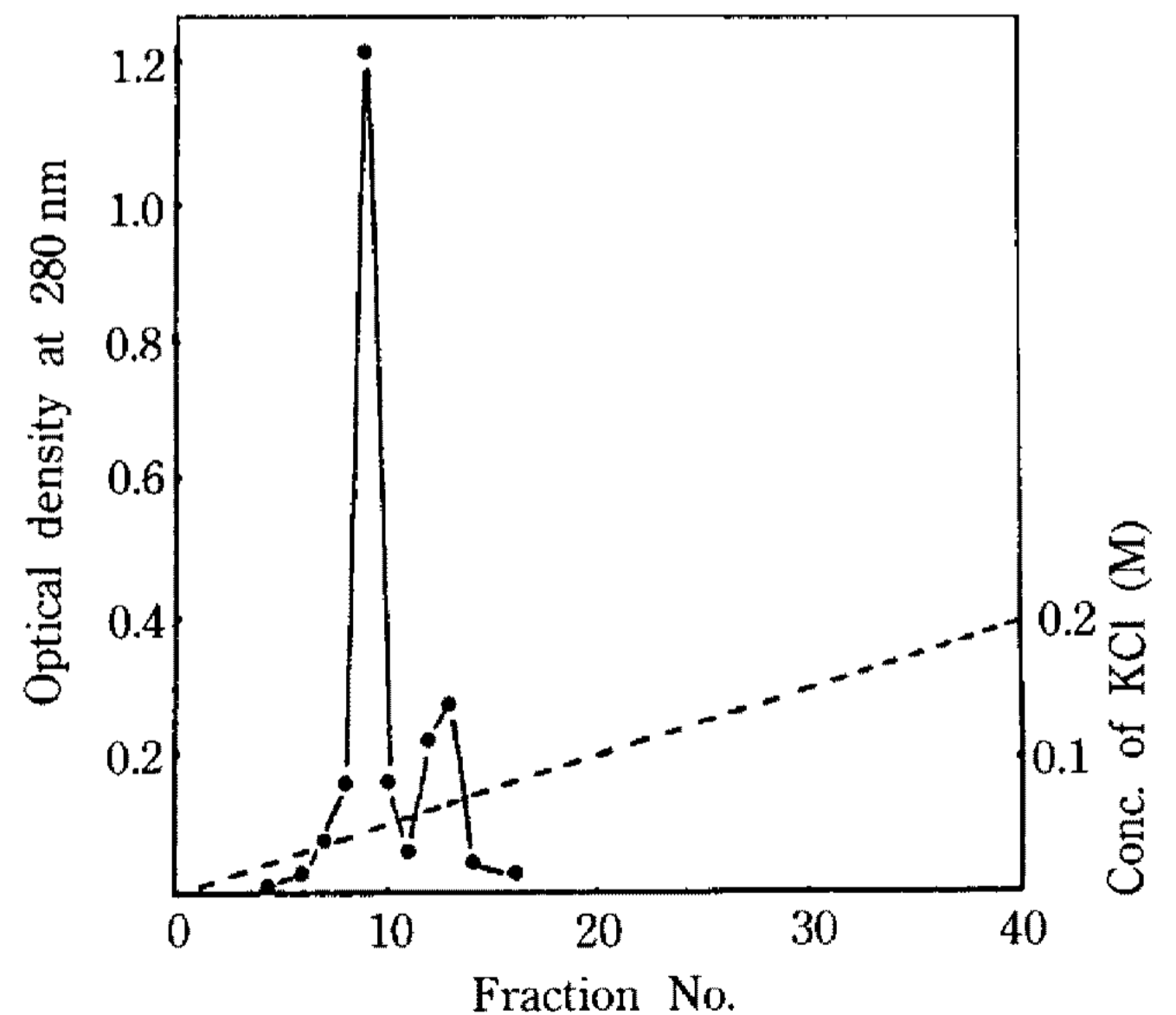


Fig. 2. DEAE-cellulose ion exchange column chromatography.

The hemolysin fraction (peak 2) from Sephadex G-100 gel filtration was charged into DEAE-cellulose column, which was swollen with 20 mM Tris-HCl buffer (pH 8.5).

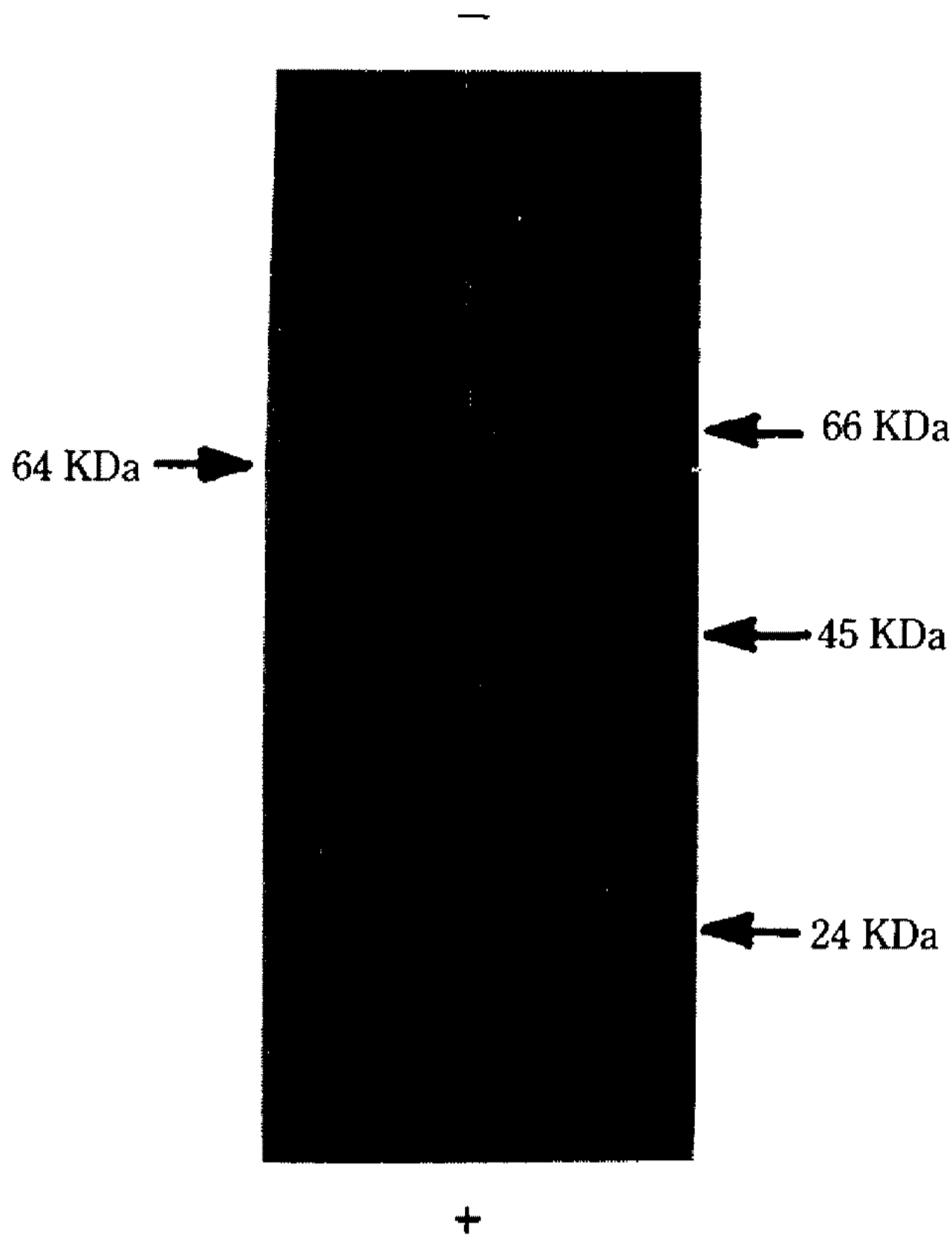


Fig. 3. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. Molecular markers were bovine serum albumin (66 KDa), egg albumin (45 KDa), and trypsinogen (24 KDa) for determination of MW of purified hemolysin.

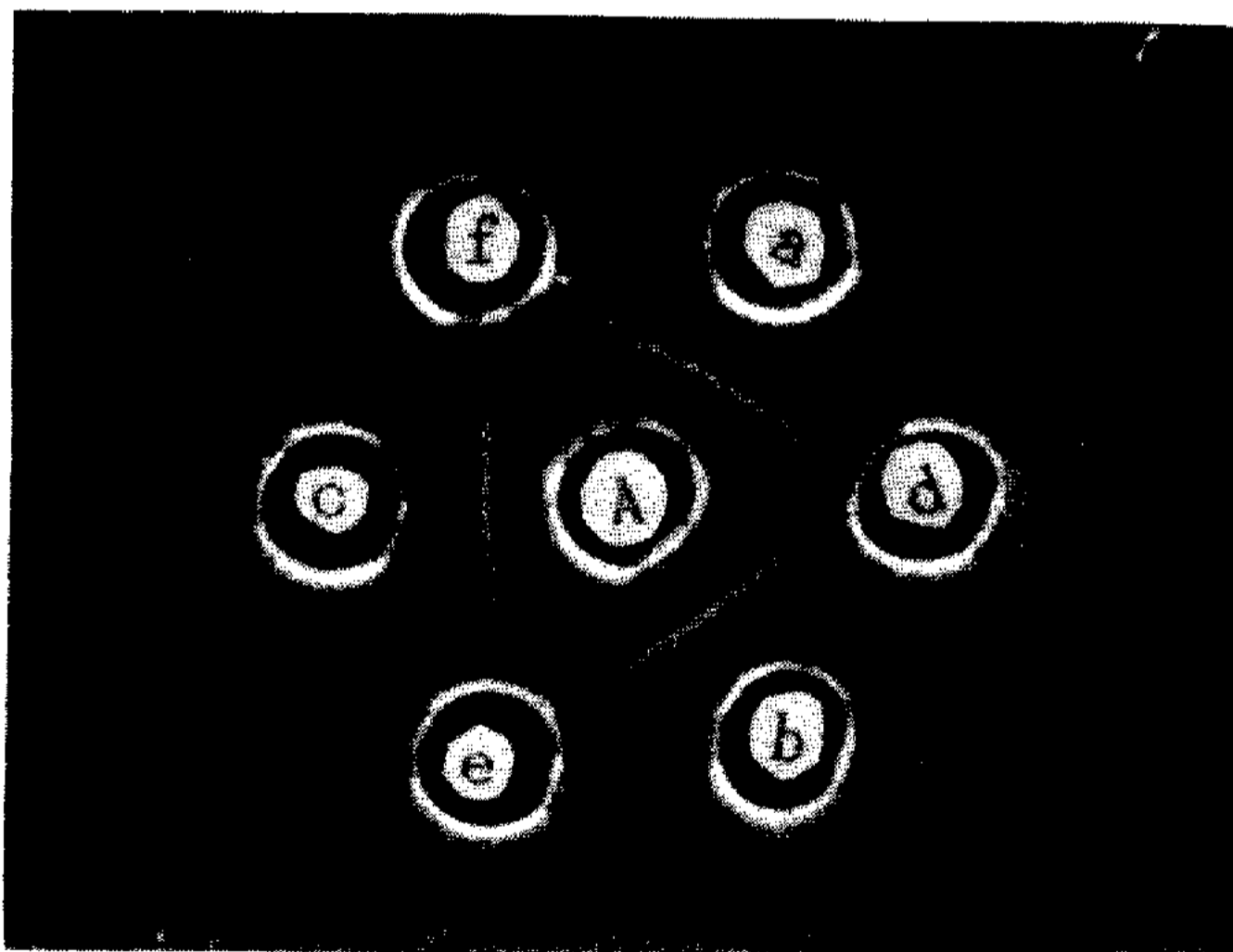


Fig. 4. Immunodiffusion pattern of purified hemolysin. Symbols: (A); IgG from purified hemolysin, (a, b, c); delta-endotoxin from Btd, (d, e, f); delta-endotoxin from Bti.

이중면역 확산법 및 효소항체법

정제된 hemolysin의 항혈청과 Btd균주의 내독소 및 Bti균주의 내독소를 이중면역 확산시킨 결과 Fig. 4

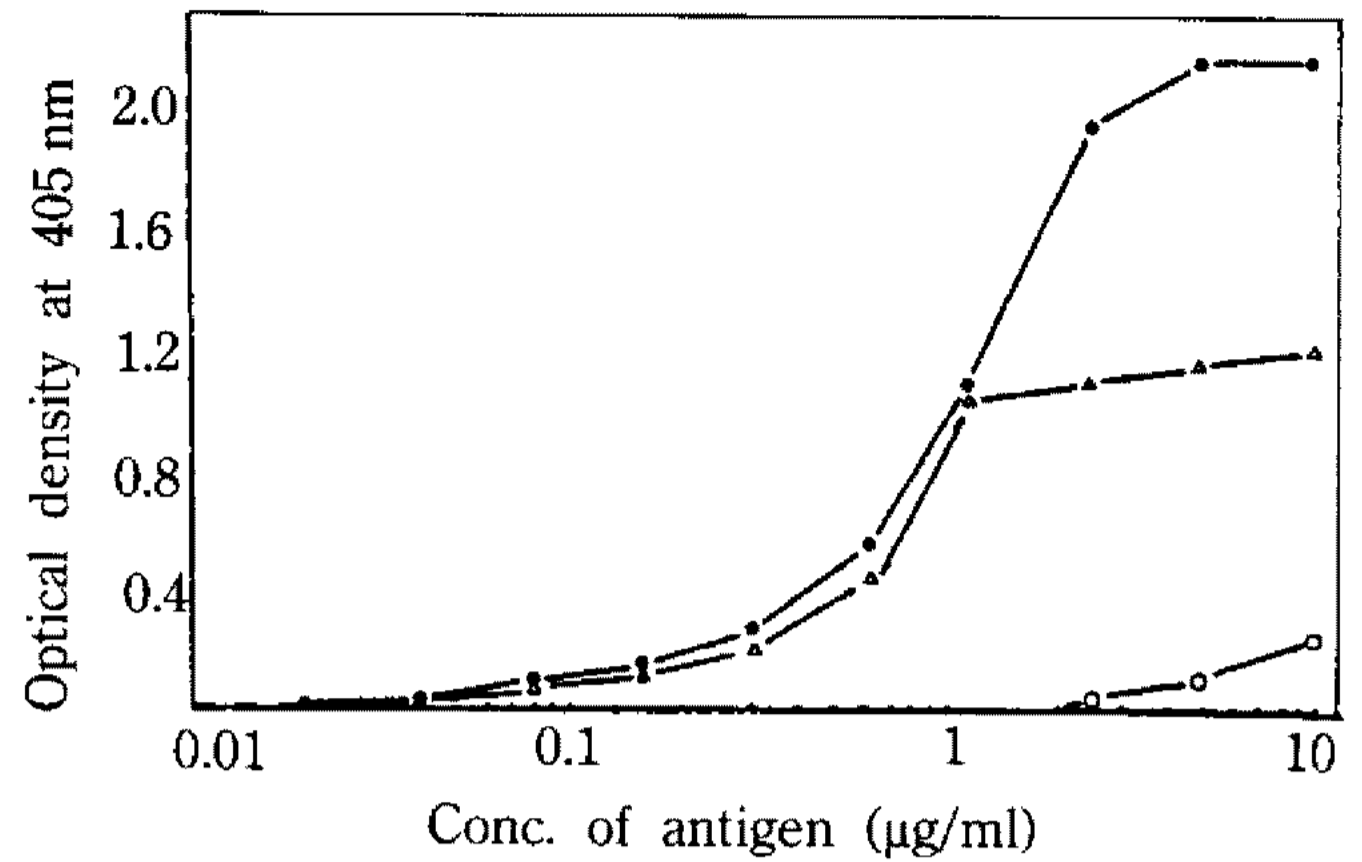


Fig. 5. Standard curve of hemolysin in delta-endotoxin from Btd.

Symbols: ●; purified hemolysin of Btd, △; delta-endotoxin of Btd, ○; delta-endotoxin of Bti.

와 같이 Bti내독소와는 침강선이 형성되지 않았으나 Btd균주의 내독소와는 단 한 개의 침강선이 형성되었다.

정제된 hemolysin과 그 항혈청을 사용하여 Bti내독소와 Btd내독소를 효소항체법(Enzyme Linked Immunoassay)으로 반응시켜 본 결과 Fig. 5에서와 같이 hemolysin 항혈청과 Bti내독소와의 반응에서는 전혀 동일성이 인정되지 않았으며, 또한 Bti 항혈청과 정제된 hemolysin과의 반응에서도 역시 동일성이 전혀 인정되지 않았다. 이는 이중면역 확산법의 결과와 동일함으로써 Btd균주의 내독소내의 hemolysin은 적어도 Bti균주의 내독소내에 함유된 독소단백질의 구성성분과는 전혀 다르다는 것을 시사한다.

요 약

B. thuringiensis subsp. *darmstadiensis* 73E10-2의 내독소에 존재하는 hemolysin이 Sephadex G-100 gel filtration과 DEAE-cellulose ion exchange column chromatography에 의해 정제되었으며, 그 순도는 SDS-PAGE와 Ouchterlony test로 확인하였다. 그 결과 정제된 hemolysin의 분자량은 64 KDa의 단백질이었으며, *in vivo* 상태에서는 전혀 모기유충에 독작용을 나타내지 않았다는 점이 28 KDa 단백질과 차이가 있었다. 또한 정제된 hemolysin과 *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*의 내독소를 효소항체법으로 검토해 본 결과 양단백질 사이에는 면역학적으로 전혀 상관성이 없었다.

감사의 말

본 연구는 1990년도 한국과학재단의 학술연구조성비(과제번호 : KOSEF 891-0407-063-2)에 의해 연구되었음을 알려드리며 관계되는 분들께 깊이 감사드립니다.

참고문헌

1. Bourgouin, C., A. Klier and G. Rapoport: *Mol. Gen. Genet.*, **205**, 309 (1986)
2. Cheung, T.Y. and K.H. Kim: *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **18**, 301 (1990)
3. Kim, K.H., M. Ohba and K. Aizawa: *J. Invertebr. Pathol.*, **44**, 214 (1984)
4. Cheung, P.Y. and B.D. Hammock: *Appl. Environ. Microbiol.*, **50**, 984 (1985)
5. Laemmli, U.K.: *Nature*, **227**, 680 (1970)
6. Lowry, O.H., H.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951)
7. Yu, Y.M., M. Ohba and K. Aizawa: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **33**, 459 (1987)
8. Reed, L.E. and H. Muench: *Amer. J. Hyg.*, **27**, 493 (1938)
9. Johnstone, A. and R. Thorpe: *Immunochemistry in practice*, Blackwell scientific Pub., 2nd ed., 140 (1987)
10. Smith, A. and J. Ulrich: *Appl. Environ. Microbiol.*, **45**, 586 (1983)
11. Voll, A., D.E. Bidwell and A. Bactlett: *Bull. World Health Organ.*, **53**, 55 (1976)
12. Drobniowski, F.A. and D.J. Ellar: *J. Bacteriol.*, **171**, 3060 (1989)

(Received March 18, 1991)